



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



# **Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias**

**Edição 2010/2011**

## **Relatório de Projecto**

### **Caracterização Microbiológica e Bioquímica de Estirpes Bacterianas Marinhas associadas à Respiração e Óxidos e Arsénio**

Bolseiro(a): Tiago Figueira

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa  
Curso: Bioquímica  
Ano: 2011

Tutor(a): Belarmino Barata

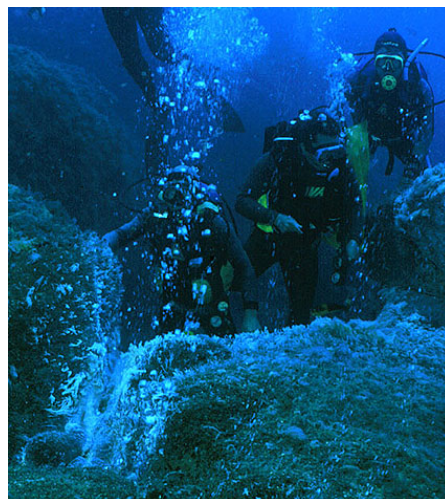
## Índice

|  |              |
|--|--------------|
| <b>1. Enquadramento do Projecto .....</b>  | <b>2-4</b>   |
| <b>2. Objectivo .....</b>  | <b>4,5</b>   |
| <b>3. Materiais e Métodos .....</b>  | <b>5-15</b>  |
| 3.1 Material Biológico .....   | 5            |
| 3.2 Cultura das Células .....  | 5-7          |
| 3.2.1 Ressuscitação das amostras .....   | 7,8          |
| 3.2.2 Plaqueamento em meio sólido .....  | 8-10         |
| 3.2.3 Crescimento em meio anaeróbico .....   | 10           |
| 3.2.4 Repicagem para meio líquido .....  | 10,11        |
| 3.2.5 Crescimento em nefalómetros .....  | 11           |
| 3.3 <i>Bioscreen</i> .....   | 12-14        |
| 3.4 Proteómica (ensaio iniciais) .....   | 14,15        |
| <b>4. Resultados .....</b>   | <b>15-21</b> |
| 4.1 Bactérias ressuscitadas crescem em meios sólidos com arsénio .....   | 15-17        |
| 4.2 Ambiente anaeróbico não contrariou a ausência de crescimento em algumas culturas .....   | 17,18        |
| 4.3 Crescimento bacterianos influenciados pela variação de extracto de levedura e de arsénio, mas não pela variação de nitrato ..... | 18-20        |
| 4.4 Necessários mais ensaios de proteómica para esclarecer questões bioquímicas .....  | 20,21        |
| <b>5 Conclusões .....</b>  | <b>21,22</b> |
| <b>6 Bibliografia .....</b>  | <b>22,23</b> |

## 1. Enquadramento do Projecto

O Banco D. João de Castro constitui uma das mais importantes formações geológicas do território insular português. A sua formação remonta ao século XVIII, altura em que ocorre a última grande erupção na zona do Rift da Terceira, num alinhamento vulcano-tectónico. Esta erupção da origem a uma pequena ilha que é no entanto reduzida por acção da erosão marinha. Apenas dois séculos depois foi virada, novamente, a atenção para a formação vulcânica que apresenta ainda hoje actividade vulcânica passiva expressa sobre a forma de crises sísmicas, pelo gradiente geotérmico que se faz sentir ao largo da zona e pelo persistente campo fumarólico que constantemente liberta gases libertados à superfície do oceano.

Esta actividade geográfica é acompanhada de perto por uma biodiversidade que se gerou no local e que é característica das condições de que o Banco D. João de Castro dispõe. A elevada concentração de gases e de substâncias tóxicas leva a uma selecção natural rigorosa onde apenas as espécies com elevada tolerância a componentes de enxofre, arsénio, etc, prosperam. A complexa fauna e flora biológica apresentada pela zona permitiram que esta fosse considerada como um “*Local de Interesse Comunitário*”, no âmbito da *Directiva Habitats* bem como integrada na *Rede Natura 2000* da União Europeia.



**Fig. 1** - Investigação Científica a decorrer no Banco D. João de Castro. [1]

O rigor a que as espécies são submetidas tem vindo a despertar a curiosidade e o interesse de muitos investigadores que vêem no local um forte ponto de estudo para organismos adaptados a condições extremas, mais concretamente, espécies extremófilas. O estudo centrado neste tipo de organismos, mais concretamente na fauna microbiana, possibilita que se fomentem teorias nos campos da Astrobiologia e da Biologia Evolutiva.

Para a primeira, o estudo é feito com o intuito de conseguir comprovar a possibilidade da existência de vida sob condições extremas muito semelhantes às que são descobertas na atmosfera de planetas considerados inóspitos.

Por outro lado, considerando que as primeiras formas de vida ocorreram em locais extremos no oceano primordial do nosso planeta, a Biologia Evolutiva centra-se no estudo de organismos extremófilos na esperança de gradualmente explicar mais detalhadamente como foi possível a origem de vida em ambientes tão complexos e rigorosos numa fase inicial da formação da vida como a conhecemos.

É nesta segunda hipótese que assenta a motivação para este projecto. Tomando a linha de pensamento assegurada pela Biologia Evolutiva, o que se pretende é estudar a fauna microbiana do Banco D. João de Castro de modo a compreender o quanto esta zona poderá oferecer como local de estudo de organismos extremófilos, uma vez que as condições subaquáticas, geradas no seio de uma formação geológica como a descrita, são emuladores válidos das condições rigorosas necessárias.

O elemento que se tomou como forte modulador da vida nestas condições foi o Arsénio. É do conhecimento geral que o arsénio é um elemento extremamente tóxico quando é exposto em quantidades superiores a uma fina linha de tolerância. O que foi reportado por vários autores é que para certos grupos de organismos unicelulares microbiotas, o arsénio incluído num óxido é não só tolerado até níveis bastante elevados, como é também uma fonte energética para uma via metabólica paralela que funcionaria de forma semelhante à cadeira transportadora de electrões no mitocôndrio, obviamente com um potencial energético mais baixo. Para este efeito considera-se um enzima fundamental possivelmente envolvido no processo, o Arsenito Oxidase. Nesta fase seria inserida uma compreensão apoiada por conhecimentos bioquímicos na área da proteómica bem como um conjunto de técnicas espectroscópicas para uma caracterização posterior do enzima purificado.

Partindo de trabalhos de outros investigadores em bactérias recolhidas não só em ambientes marinhos mas também noutros ambientes extremos (minas, etc), o nosso conhecimento do enzima foi moldado para o tomarmos como localizado no periplasma da células, sendo este fortemente dependente de um centro activo que complexa Molibdénio. O molibdénio será o principal interveniente no processo de transferência de electrões que se associa a este enzima devido aos vários estados de oxidação que este metal pode aceitar.

Devido a este facto grande parte da investigação realizada neste projecto basear-se-á na premissa de que o enzima e, consequentemente, todo o metabolismo de arsénio será, até certo ponto, dependente da disponibilidade de molibdénio para as bactérias.

É importante enfatizar que o estudo desenvolvido neste projecto tem em vista a caracterização tanto microbiológica, no que toca a crescimentos diferenciais e acção do arsénio no desenvolvimento do organismo, como também bioquímica, relativamente a diferenças na maquinaria proteica expressa pelas bactérias sujeitas ou não ao arsénio sob a forma de óxido, o arsenito.

## **2. Objectivo**

Apesar de ter sido já implicitamente descrito qual o objectivo do projecto alguns pontos deverão ser esclarecidos. O principal objectivo deste projecto é a caracterização do material biológico recolhido no Banco D. João de Castro a nível microbiológico e a nível bioquímica, neste último incluindo a caracterização espectroscópica. Pretende-se obter conhecimento sob a fauna microbiana marítima da zona e compreender se a tolerância ao arsénio e outros compostos deletérios poderá explicar a elevada adaptabilidade às características do local.

A caracterização bioquímica pretende, ainda que de forma algo remota, obter detalhes sobre o centro activo do enzima que será responsável pela destoxificação do arsénio endógeno e compreender se a estrutura molecular deste centro activo é de alguma forma idêntico ao reportado por outros autores cuja investigação se debruçou igualmente no papel do arsénio.

Um outro objectivo primário do projecto seria, através dos possíveis achados científicos do projecto permitir o aumento do interesse científico do local para níveis superiores e isto levar ao alargamento da plataforma continental ao largo dos Açores. Este último objectivo é algo utópico e seria necessária uma descoberta de certa magnitude para justificar a alteração ao território nacional como fruto da investigação científica do local. De qualquer maneira a ambição foi sempre um princípio neste projecto e até ao final das suas potencialidades será sempre motivado por objectivos como este.

## **3. Materiais e Métodos**

Todo o material utilizado no decorrer deste projecto foi disponibilizado pelo Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT), sendo que em algumas fases do trabalho o material e equipamento foi cedido pelo Departamento de Química e

Bioquímica (DQB). No ICAT foi desenvolvido o estudo do crescimento microbiano enquanto no DQB foi realizada a fase da proteómica relativa às células cultivadas.

### **3.1 Material Biológico**

O material biológico de partida foi proveniente de sedimentos obtidos à profundidade de 3 metros no banco D. João de Castro. Estes sedimentos foram introduzidos em recipientes posteriormente selados e congelados, com diferentes meios de cultura/conservação, em respectivo duplicado, com o intuito de preparar os organismos recolhidos nesses sedimentos para a fase de cultura que se veio a desenvolver no projecto.

Os meios em que os sedimentos foram armazenados continham extrato de levedura ou tungsténio (que mais tarde viria a ser substituído pelo molibdénio nos meios de cultura), sendo complementados com lactato+nitrato, lactato+sulfato ou glutamato (como fonte de carbono).

A recolha do inóculo destes recipientes foi realizada com uma seringa de 1 mL.

### **3.2 Cultura das Células**

Previamente ao cultivo das células, foi preparado um conjunto de soluções para a preparação dos meios de cultura que vieram a ser preparados mais tarde quer em suporte líquido quer em sólido.

As soluções preparadas foram as seguintes:

- Arsenito de Sódio 50 mM
- Hidrogenocarbonato de Sódio 6 mM
- Cloreto de Sódio 3% (m/V)
- Nitrato de Potássio 15 mM
- Molibdato de Sódio 8  $\mu$ M
- Tampão Fosfato 0.5 M pH 7
- Lactato de Sódio 50 mM
- Glutamato de Sódio 50 mM
- Extrato de Levedura 2.5% (m/V)

Foram ainda preparadas soluções de mistura como suplementos para os meios de crescimento:

Solução de Vitaminas (1L): - 5 mg ácido *p*-aminobenzóico

- 5 mg ácido fólico

Perfazer com água.

- 5 mg biotina

- 5 mg ácido nicotínico

- 5 mg riboflavina

- 5 mg tiamina de HCl

Solução de Oligoelementos (1L): - 20 mg cloreto de ferro (tetrahidratado)

- 10 mg cloreto de zinco

Perfazer com água.

- 2 mg cloreto de cobre (dihidratado)

- 10 mg cloreto de cobalto (hexahidratado)

- 3 mg cloreto de níquel (hexahidratado)

- 10 mg cloreto de manganês

- 6 mg selenito de sódio (pentahidratado)

- 300 mg sulfato de magnésio (heptahidratado)

- 10 mg cloreto de cálcio (dihidratado)

Solução Base (1L):

- 0.7 g sulfato de sódio (decahidratado)

- 0.5 g cloreto de potássio

- 0.4 g cloreto de magnésio (hexahidratado)

Perfazer com tampão.

- 1 g sulfato de amónia

- 0.5 g cloreto de cálcio (dihidratado)

Estas soluções foram usadas em toda a fase de caracterização microbiológica das células provenientes dos sedimentos recolhidos no Banco D. João de Castro.

É importante referir que todos os procedimentos de preparação e inoculação dos meios de cultura foram realizados em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar horizontal. Todas as soluções à excepção da solução de vitaminas (a qual foi filtrada em ambiente estéril) foram autoclavadas antes de utilização.

### 3.2.1 Ressuscitação das amostras

Para possibilitar o cultivo das células foi necessário proceder a um passo inicial de ressuscitação das amostras congeladas. O estado de crio conservação a que os sedimentos foram submetidos impossibilita o crescimento das células nos seus ciclos normais de maturação pelo que estes foram introduzidos em meios líquidos para potenciar a sua activação antes de qualquer plaqueamento.

A constituição dos meios de ressuscitação foi a seguinte:

**Quadro 1.** Constituição dos meios de ressuscitação. Os valores apresentados correspondem ao volume a adicionar de cada componente (mL). O volume final de cada meio é de 10 mL incluindo o volume de inoculo. (Y- extrato de levedura; Mo – Molibdénio)

| Meios de Ressuscitação |           |            |             |              |             |              |
|------------------------|-----------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
|                        | Lactato+Y | Lactato+Mo | Carbonato+Y | Carbonato+Mo | Glutamato+Y | Glutamato+Mo |
| Lactato                | 1         | 1          | -           | -            | -           | -            |
| Carbonato              | -         | -          | 1           | 1            | -           | -            |
| Glutamato              | -         | -          | -           | -            | 1           | 1            |
| Extrato de Levedura    | 1         | -          | 1           | -            | 1           | -            |
| Molibdénio             | -         | 1          | -           | 1            | -           | 1            |
| Nitrato                | 1         | 1          | 1           | 1            | -           | -            |
| Água                   | 1         | 1          | 1           | 1            | 2           | 2            |
| Sol. Tampão            |           |            |             | 1            |             |              |
| Sol. Base              |           |            |             | 1            |             |              |
| Sol. NaCl              |           |            |             | 1            |             |              |
| Sol. Vitaminas         |           |            |             | 1            |             |              |
| Sol. Oligoelementos    |           |            |             | 1            |             |              |
| Inóculo                |           |            |             | 1            |             |              |

Para um total de seis meios de ressuscitação, foram escolhidas as amostras mais apropriadas para proceder à inoculação. Para os meios de lactato a amostra de sedimentos escolhida foi a mantida com lactato+nitrato, assim como para os meios de carbonato. Para os meios de glutamato a amostra de sedimentos a partir da qual se inoculou foi a mantida com Caldo Knorr®. É implícito que para os meios com extrato foi usada a amostra mantida igualmente em extrato de levedura, assim como para as amostras com tungsténio, inoculadas nos meios com molibdénio.

É neste passo que se abandona a perspectiva de utilização de tungsténio como metal em foco, passando a considerar-se o molibdénio como principal metal influente na desintoxicação ao arsénio.



Para este passo não é realizado o duplicado uma vez que se pretende apenas que as células sejam activadas e que se verifique um crescimento num meio não deletério.

### 3.2.2 Plaqueamento em meio sólido

Quando os meios de ressuscitação apresentaram crescimento, procedeu-se ao seu plaqueamento. O plaqueamento em meio sólido teve como objectivo não só o teste inicial com meios aos quais havia sido adicionado arsénio mas também a análise das características morfológicas relativas às colónias de cada meio. Estes meios sólidos foram preparados em duplicado para contrariar qualquer erro no momento da inoculação ou para o caso de se observar contaminação.

Preparou-se um total de 40 placas, para 20 meios distintos. Cada placa recebe um total de 20 mL, sendo a concentração de ágar por placa de 1.5% (m/V).

A constituição dos meios foi a seguinte:

**Quadro 2.** Constituição dos meios sólidos (fracção não comum). Esta fracção é preparada em *falcon* de 50 mL e não é autoclavada com o ágar.

| Placa | Lactato   | Nitrato | Água | Molibdénio | Extrato de Levedura | Arsenito          |
|-------|-----------|---------|------|------------|---------------------|-------------------|
| 1     | 2.5       | 0       | 5    | 0          | 2.5                 | 0                 |
| 2     | 2.5       | 0       | 5    | 2.5        | 0                   | 0                 |
| 3     | 2.5       | 2.5     | 2.5  | 0          | 2.5                 | 0                 |
| 4     | 2.5       | 2.5     | 2.5  | 2.5        | 0                   | 0                 |
| 5     | 2.5       | 0       | 2.5  | 0          | 2.5                 | 2.5               |
| 6     | 2.5       | 0       | 2.5  | 2.5        | 0                   | 2.5               |
| 7     | 2.5       | 2.5     | 0    | 0          | 2.5                 | 2.5               |
| 8     | 2.5       | 2.5     | 0    | 2.5        | 0                   | 2.5               |
| -     | Carbonato | Nitrato | Água | Molibdénio | Extrato de Levedura | Arsenito/Arsenato |
| 9     | 2.5       | 0       | 5    | 0          | 2.5                 | 0                 |
| 10    | 2.5       | 0       | 5    | 2.5        | 0                   | 0                 |
| 11    | 2.5       | 2.5     | 2.5  | 0          | 2.5                 | 0                 |
| 12    | 2.5       | 2.5     | 2.5  | 2.5        | 0                   | 0                 |
| 13    | 2.5       | 0       | 2.5  | 0          | 2.5                 | 2.5               |
| 14    | 2.5       | 0       | 2.5  | 2.5        | 0                   | 2.5               |
| 15    | 2.5       | 2.5     | 0    | 0          | 2.5                 | 2.5               |
| 16    | 2.5       | 2.5     | 0    | 2.5        | 0                   | 2.5               |
| -     | Glutamato | Nitrato | Água | Molibdénio | Extrato de Levedura | Arsenito/Arsenato |

|    |     |   |     |     |     |     |
|----|-----|---|-----|-----|-----|-----|
| 17 | 2.5 | 0 | 5   | 0   | 2.5 | 0   |
| 18 | 2.5 | 0 | 5   | 2.5 | 0   | 0   |
| 19 | 2.5 | 0 | 2.5 | 0   | 2.5 | 2.5 |
| 20 | 2.5 | 0 | 2.5 | 2.5 | 0   | 2.5 |

A fracção não comum corresponde à composição que dá as características a cada meio e que não pode ser assim preparada para o conjunto dos duplicados. A fracção comum é assim constituída por:

**Quadro 3.** Constituição dos meios sólidos (fracção comum). Esta fracção é preparada em frascos schott de 1 L.

| Solução        | V <sub>total</sub><br>/mL |
|----------------|---------------------------|
| Sol. Tampão    | 10 (por<br>placa)         |
| Sol. Base      |                           |
| Sol. NaCl      |                           |
| Oligoelementos |                           |
| Sol. Vitaminas |                           |

Esta fracção comum é preparada para o volume total necessário às 40 placas e autoclavada com a quantidade de ágar necessária para o total de placas. Esta solução comum é então adicionada a cada fracção não comum para prefazer um total de 20 mL, volume que é adicionado à placa de Petri.

Relembra-se que a solução de vitaminas não pode ser autoclavada uma vez que os compostos são termolábeis e é assim filtrada e adicionada à solução comum após esta ser autoclavada.

O esquema de plaqueamento partindo dos meios de ressuscitação é o apresentado no Quadro 4.

**Quadro 4.** Correspondência dos meios de ressuscitação aos respectivos meios sólidos para inoculação.

| Meios        | Placas          |
|--------------|-----------------|
| Lactato+Y    | 1, 3, 5 e 7     |
| Lactato+Mo   | 2, 4, 6 e 8     |
| Carbonato+Y  | 9, 11, 13 e 15  |
| Carbonato+Mo | 10, 12, 14 e 16 |
| Glutamato+Y  | 17 e 19         |
| Glutamato+Mo | 18 e 20         |

O inoculo adicionado a cada placa foi de 200  $\mu$ L do meio de ressuscitação, espalhado com pérolas de vidro.

Os duplicados não foram crescidos à mesma temperatura sendo que se testou este efeito à temperatura ambiente e à temperatura de 30° C.

Como é possível observar, trabalhamos com quatro variáveis: extracto de levedura ou molibdénio, presença ou não de nitrato, presença ou não de arsénio e uma de três fontes de carbono distintas (lactato, carbonato e glutamato). O objectivo na variedade de possibilidades é a de garantir que se combrem todas as possibilidades de variação possível para que um crescimento ausente na presença de arsénio possa ser confrontado com um crescimento positivo quando este não é constituinte do meio.

### **3.2.3 Crescimento em meio anaeróbico**

Foram realizados crescimentos em meio anaeróbico recorrendo ao uso de um vaso selado com capacidade de criar vácuo interno e introduzir azoto de modo a gerar um ambiente livre de oxigénio.

Neste vaso foram introduzidas dois tipos de amostras. Por um lado após o primeiro plaqueamento, foram introduzidas no vaso anaeróbico as placas para as quais o crescimento foi nulo, com o intuito de criar novas condições para o crescimento do inóculo. Por outro lado as placas foram repetidas (agora sem duplicado) e introduzidas logo após inoculação no interior do vaso. Com este último ensaio pretendia-se que as culturas ressuscitadas fossem plaqueadas e não tivessem tempo de contacto com o meio aeróbico aumentando a probabilidade de se evocar uma via alternativa de respiração que seria inibida pela presença de oxigénio.

### **3.2.4 Repicagem para meio líquido**

Após conhecimento do resultado dos crescimentos em meio sólido procedeu-se à preparação de meios líquidos em tudo semelhantes aos meios preparados para as placas. A única ausência na constituição é obviamente o ágar sendo o volume final mantido nos 20 mL.

A repicagem foi realizada com palitos de madeira estéreis tentando extrair colónias isoladas com o crescimento mais proeminente, quando foi o caso disso, ou simplesmente recolhendo uma pequena porção do crescimento microbiano quando o

este foi mais denso. Estas culturas líquidas estão prontas para análise em *Bioscreen*, tal como será descrito mais á frente.

A escolha dos crescimentos para repicagem prendeu-se com o interesse no âmbito do projecto e também na qualidade do próprio crescimento (crescimentos em colónia isolada são privilegiados)

### 3.2.5 Crescimento em nefalómetro

Esta fase do trabalho vem já após o conhecimento das curvas de crescimento para cada tipo de células nos respectivos meios, obtidas pela técnica de *Bioscreen*.

O que se irá preparar são meios para os quais se terão agora em conta os dados obtidos das curvas de crescimento e as variáveis que se aplicaram. Pretende-se que para cada fonte de carbono se tenham meios comparativos com e sem arsénio e, preferivelmente, sem extracto de levedura e com molibdénio uma vez que um meio quimicamente definido é para o benefício da caracterização das bactérias.

Para um total de doze nefalómetros foram preparados meios de volume total de 20 mL, seis para meios com extrato de levedura e outros seis para meios mínimos com molibdénio. Dentro de cada um destes conjuntos de seis, três correspondem a cada fonte de carbono, sem exposição ao arsénio e os três restantes às mesmas fontes de carbono mas com exposição ao arsénio.

Durante o espaço de uma semana foram crescidas as células nestes meios e acompanhado o crescimento por medição da densidade óptica num espectrofotómetro *Spectronic 20D*. As células foram recolhidas para os ensaios de proteómica quando se observou um crescimento significativo ( $OD \geq 1$ ).

### 3.3 *Bioscreen*

Foram preparados dois ensaios em *Bioscreen* para os quais se testou respectivamente a importância relativa do extrato de levedura e molibdénio no crescimento (na presença e ausência de arsénio) e a influência da variação da fonte de carbono, de nitrato e de arsénio para a sobrevivência das bactérias.

Os meios foram preparados em placas de 100 poços para um volume final de cada poço de 300  $\mu$ L. Os inóculos utilizados neste ensaio foram os resultantes das repicagens para meio líquido, os quais têm já as culturas do nosso interesse.

Para o primeiro ensaio, relativo à importância do extrato de levedura e molibdénio na presença e ausência de arsénio, a constituição dos meios foi a apresentada nos Quadros 5 e 6.

**Quadro 5.** Constituição dos poços para o primeiro ensaio de crescimento em *Bioscreen* na ausência de Arsénio. Cada coluna equivale a um poço distinto a testar num total de 7 poços por fonte de carbono.

| Componentes                    | Poços                    |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                | Volumes a adicionar (μL) |      |      |      |      |      |      |
| Meio Comum                     | 150                      | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  |
| Glutamato, Lactato e Carbonato | 37.5                     | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 |
| Extrato de levedura            | 37.5                     | 35   | 25   | 15   | 10   | 5    | -    |
| Molibdénio                     | -                        | 2.5  | 12.5 | 22.5 | 27.5 | 32.5 | 37.5 |
| Água                           | 45                       | 45   | 45   | 45   | 45   | 45   | 45   |
| Arsénio                        | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Nitrato                        | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <b>Inóculo</b>                 | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| <b>V<sub>f</sub></b>           | 300                      |      |      |      |      |      |      |

**Quadro 6.** Constituição dos poços para o primeiro ensaio de crescimento em *Bioscreen* na presença de Arsénio. Cada coluna equivale a um poço distinto a testar num total de 7 poços por fonte de carbono.

| Componentes                    | Poços                    |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                | Volumes a adicionar (μL) |      |      |      |      |      |      |
| Meio Comum                     | 150                      | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  |
| Glutamato, Lactato e Carbonato | 37.5                     | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 |
| Extrato de levedura            | 37.5                     | 35   | 25   | 15   | 10   | 5    | -    |
| Molibdénio                     | -                        | 2.5  | 12.5 | 22.5 | 27.5 | 32.5 | 37.5 |
| Água                           | 7.5                      | 7.5  | 7.5  | 7.5  | 7.5  | 7.5  | 7.5  |
| Arsénio                        | 37.5                     | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 |
| Nitrato                        | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <b>Inóculo</b>                 | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| <b>V<sub>f</sub></b>           | 300                      |      |      |      |      |      |      |

Para o segundo ensaio relativo à variação da concentração das fontes de carbono, nitrato e arsénio a constituição dos poços foi a apresentada nos Quadros 7, 8 e 9.

**Quadro 7.** Constituição dos poços para o segundo ensaio de crescimento em *Bioscreen* relativos à variação da fonte de carbono. Cada coluna equivale a um poço distinto a testar num total de 7 poços por fonte de carbono.

| Poços                          |                          |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Componentes                    | Volumes a adicionar (μL) |      |      |      |      |      |      |
| Meio Comum                     | 150                      | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  |
| Glutamato, Lactato e Carbonato | -                        | 2.5  | 12.5 | 22.5 | 27.5 | 32.5 | 37.5 |
| Extrato de levedura            | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| Molibdénio                     | 15                       | 15   | 15   | 15   | 15   | 15   | 15   |
| Água                           | 75                       | 72.5 | 62.5 | 52.5 | 47.5 | 42.5 | 37.5 |
| Arsénio                        | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Nitrato                        | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <b>Inóculo</b>                 | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| <b>V<sub>f</sub></b>           | 300                      |      |      |      |      |      |      |

**Quadro 8.** Constituição dos poços para o segundo ensaio de crescimento em *Bioscreen* relativos à variação de arsénio. Cada coluna equivale a um poço distinto a testar num total de 7 poços por fonte de carbono.

| Poços                          |                          |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Componentes                    | Volumes a adicionar (μL) |      |      |      |      |      |      |
| Meio Comum                     | 150                      | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  |
| Glutamato, Lactato e Carbonato | 37.5                     | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 |
| Extrato de levedura            | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| Molibdénio                     | 15                       | 15   | 15   | 15   | 15   | 15   | 15   |
| Água                           | 37.5                     | 35   | 25   | 15   | 10   | 5    | -    |
| Arsénio                        | -                        | 2.5  | 12.5 | 22.5 | 27.5 | 32.5 | 37.5 |
| Nitrato                        | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <b>Inóculo</b>                 | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| <b>V<sub>f</sub></b>           | 300                      |      |      |      |      |      |      |

**Quadro 9.** Constituição dos poços para o segundo ensaio de crescimento em *Bioscreen* relativos à variação de nitrato. Cada coluna equivale a um poço distinto a testar num total de 7 poços por fonte de carbono.

| Poços                |                          |      |      |      |      |      |      |
|----------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Componentes          | Volumes a adicionar (μL) |      |      |      |      |      |      |
| Meio Comum           | 150                      | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  | 150  |
| Lactato              | 37.5                     | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 | 37.5 |
| Extrato de levedura  | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| Molibdénio           | 15                       | 15   | 15   | 15   | 15   | 15   | 15   |
| Água                 | 37.5                     | 35   | 25   | 15   | 10   | 5    | -    |
| Arsénio              | -                        | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Nitrato              | -                        | 2.5  | 12.5 | 22.5 | 27.5 | 32.5 | 37.5 |
| <b>Inóculo</b>       | 30                       | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   |
| <b>V<sub>f</sub></b> | 300                      |      |      |      |      |      |      |

Para cada poço foi realizado o respectivo duplicado, às mesmas condições de modo a possibilitar um tratamento de dados mais realista.

*Bioscreens* realizados a 30° C com agitação durante um espaço de 9 dias para o primeiro ensaio e de 6 dias para o segundo.

Não são apresentados os esquemas da disposição dos poços preparados para cada ensaio uma vez que a informação para a realização dos mesmos já se encontra disponibilizada. A ordem de cada poço prende-se apenas com a lógica do utilizador, seguindo as constituições apresentadas.

### 3.4 Proteómica (ensaio iniciais)

Os ensaios de proteómica foram realizados recorrendo às culturas líquidas preparadas em nefalómetro. Estas células foram sujeitas a uma preparação prévia antes de serem analisadas por electroforese:

- Passagem das culturas para *falcons* de 50 mL
- Centrifugação a 5000 rpm 10 min (4° C)
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de tampão RIPA
- Sonificar cada amostra 5 vezes em ciclos de 10 segundos
- Aliquotar para *eppendorf* em fracções de 1 mL, 5 μL e 2 μL.

Nesta fase a amostra está pronta para ser corrida em gel de SDS-PAGE de poliacrilamida. O gel de concentração preparado foi de 4 % enquanto o gel resolvente foi de 12%.

Gel de Concentração (4%):

250  $\mu$ L 40% Acril/Bis  
630  $\mu$ L 0.5 M Tris-HCl pH 6.8  
25  $\mu$ L 10% SDS  
1.59 mL Água  
2.5  $\mu$ L TEMED  
12.5  $\mu$ L 10% APS

Gel de Resolução (12%):

1.5 mL 40% Acril/Bis  
1.25 mL 1.5 M Tris-HCl pH 8.8  
50  $\mu$ L 10% SDS  
2.175 mL Água  
2.5  $\mu$ L TEMED  
25  $\mu$ L 10% APS

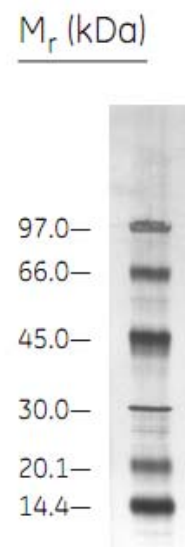
- Às aliquotas de 2 e 5  $\mu$ L são adicionados 30  $\mu$ L de tampão de aplicação (Running buffer)
- Amostras são corridas em 2 géis, um para cada volume de amostra, a 80 V durante uma hora e depois 120 V até ao fim da electroforese.

Neste projecto foram apenas corridos os meios de cultura em nefalómetro crescidos com extracto de levedura. O volume aplicado no gel para cada amostra foi de 10  $\mu$ L.

Os padrões de massa molecular proteicos utilizados foram os *Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* com 6 proteínas altamente purificadas.

A coloração e revelação dos geis foram feitas por aplicação, respectivamente, de *staining* e *destaining solution*, com a primeira feita durante a noite, de um dia para o outro, e a descoloração durante um espaço de tempo de 3-4 horas.

**Figura 2.** Padrões de massa molecular *Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis*, utilizados para calibrar as amostras aplicadas nos geis.



## 4. Resultados

### 4.1 Bactérias ressuscitadas crescem em meios sólidos com arsénio



O plaqueamento em meio sólido das bactérias ressuscitadas foi o primeiro teste da tolerância das mesmas ao arsénio e à sustentabilidade de um meio mínimo de molibdénio. Onze dias após a inoculação nos meios sólidos foi visível já crescimento nos meios sem arsénio, uma indicação de que de facto as bactérias foram afectadas negativamente pela presença do arsénio mas mesmo assim para certos meios detectou-se a presença de colónias isoladas.

Dez dias depois da primeira análise dos meios sólidos procedeu-se a nova comparação dos crescimentos. Esta segunda observação prendeu-se com a nossa expectativa face aos crescimentos na presença de arsénio.

Foram comparados igualmente os crescimentos à temperatura ambiente e a 30°C, de modo a compreender se as bactérias seriam sensíveis ao aumento de temperatura e se este aumento potenciaria o seu crescimento. O que se observou foi que à temperatura superior, os crescimentos foram acelerados o que aponta para que, no meio natural, a temperatura da zona de recolha seja influenciada pelo gradiente geotérmico do Banco D. João de Castro.

No Quadro 10 e 11 são resumidas as observações qualitativas dos crescimentos nas duas observações, respectivamente para a temperatura ambiente e para os 30° C.

**Quadro 10.** Análise quantitativa dos crescimentos bacterianos para os meios sólidos mantidos à temperatura ambiente, nas duas datas de observação.

|                  |                           |         | 1ª Observação |             | 2ª Observação |             |
|------------------|---------------------------|---------|---------------|-------------|---------------|-------------|
|                  |                           |         | Crescimento   |             |               |             |
| Fonte de Carbono | Meio Principal Componente | Nitrato | Sem Arsénio   | Com Arsénio | Sem Arsénio   | Com Arsénio |
| Glutamato        | Y                         | Não     | +++           | +           | /             | /           |
|                  | Mo                        | Não     | +             | -           | /             | +           |
| Carbonato        | Y                         | Não     | ++            | -           | /             | +           |
|                  | Mo                        | Não     | +             | -           | /             | /           |
|                  | Y                         | Sim     | ++            | -           | /             | /           |
|                  | Mo                        | Sim     | +             | -           | /             | /           |
| Lactato          | Y                         | Não     | +             | -           | /             | +           |
|                  | Mo                        | Não     | -             | -           | /             | /           |
|                  | Y                         | Sim     | ++            | -           | /             | /           |
|                  | Mo                        | Sim     | -             | -           | /             | /           |

/ - não são observadas alterações

**Quadro 11.** Observação quantitativa dos crescimentos bacterianos para os meios sólidos mantidos a 30° C, nas duas datas de observação.

|                  |                           |         | 1ª Observação |             | 2ª Observação |             |
|------------------|---------------------------|---------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Fonte de Carbono | Meio Principal Componente | Nitrato | Crescimento   |             |               |             |
|                  |                           |         | Sem Arsénio   | Com Arsénio | Sem Arsénio   | Com Arsénio |

|           |    |     |     |    |     |    |
|-----------|----|-----|-----|----|-----|----|
| Glutamato | Y  | Não | +++ | ++ | /   | /  |
|           | Mo | Não | +   | -  | /   | +  |
| Carbonato | Y  | Não | +++ | +  | /   | ++ |
|           | Mo | Não | ++  | -  | /   | /  |
|           | Y  | Sim | ++  | -  | /   | /  |
|           | Mo | Sim | +++ | +  | /   | /  |
| Lactato   | Y  | Não | ++  | +  | +++ | ++ |
|           | Mo | Não | -   | -  | /   | /  |
|           | Y  | Sim | +   | -  | /   | /  |
|           | Mo | Sim | -   | -  | /   | /  |

/ - não são observadas alterações

Os meios com arsénio apresentam visivelmente menor crescimento mas apesar de tudo tem-se, para certos meios um visível crescimento em meios com arsénio, principalmente quando está presente o extracto de levedura e para o caso do lactato e glutamato. Os meios mínimos que contêm molibdénio não parecem propiciar ao crescimento com arsénio à excepção de quando se tem o carbonato como fonte de carbono.

Observações à lupa electrónica evidenciaram que o tipo de colónias/ bactérias para as diferentes fontes de carbono são morfologicamente distintas umas das outras, embora o mesmo não se possa comprovar para meios com e sem arsénio. Neste caso, o que aparenta acontecer é a resistência do mesmo tipo de colónias observadas quando o arsénio se encontra ausente.

A atenção do trabalho volta-se assim para as colónias resistentes ao arsénio e aos mecanismos que poderão ser responsáveis pela resistência em certas condições e noutras não. São assim repicados os meios com glutamato, carbonato e lactato na presença de extracto de levedura e arsénio.

#### **4.2 Ambiente anaeróbico não contrariou a ausência de crescimento em algumas culturas**

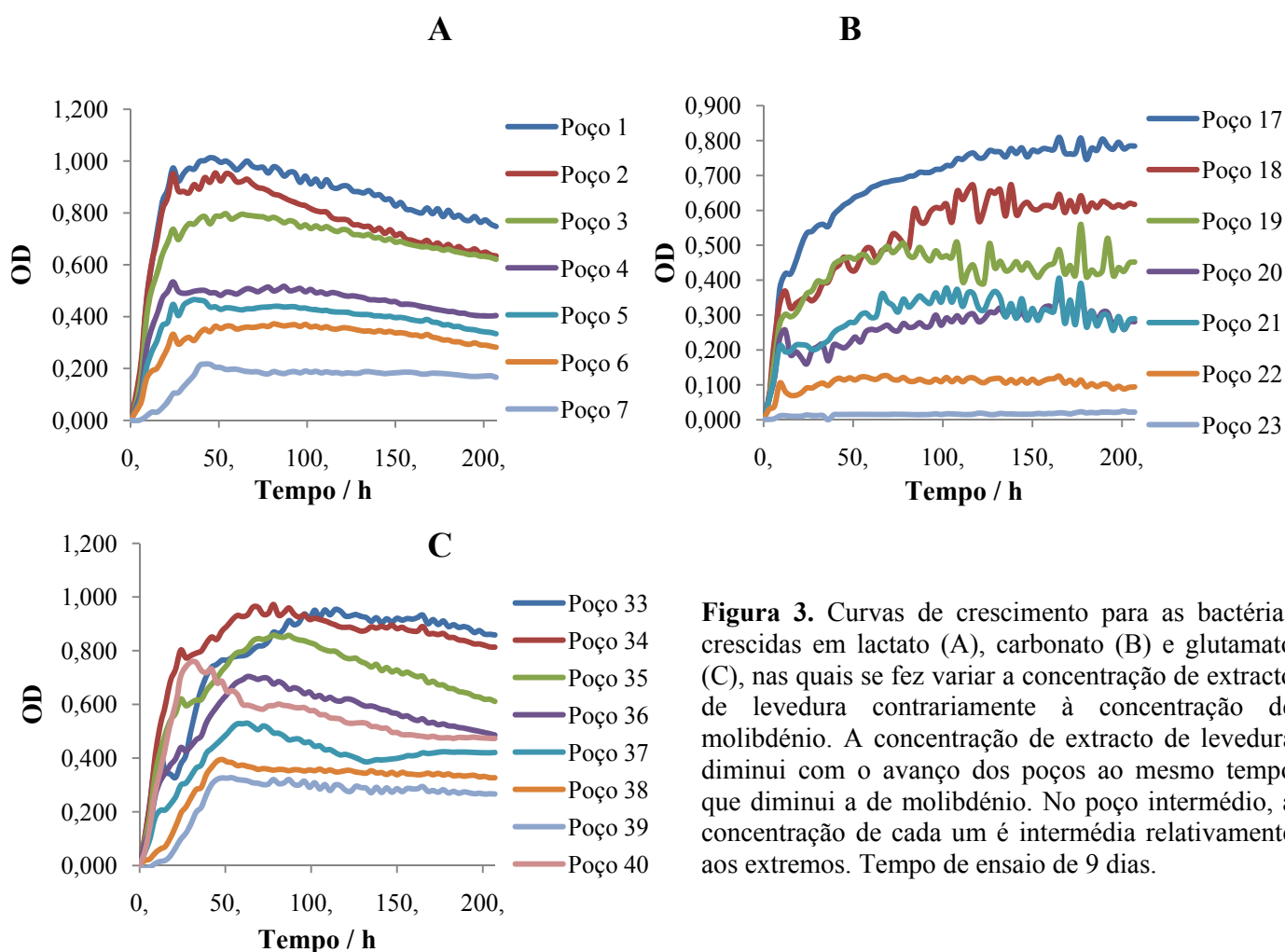
Como foi descrito, para as culturas nas quais não se observou crescimento optou-se por submete-las a um ambiente anaeróbico gerado no interior de um vaso selado em que se substituíu o ar por azoto.

As culturas foram deixadas neste ambiente durante o espaço de tempo equivalente ao seu crescimento normal mas ao fim dos onze dias não foi possível observar alterações nas culturas. Este resultado aponta para que a ausência de crescimento não é devida ao bloqueio da via de metabolismo de arsénio pelo oxigénio.

O fundamento por detrás deste detalhe é que se de facto o arsénio pudesse contribuir com uma via secundária produtora de energia para a célula, a presença de oxigénio levaria à secundarização desta mesma via e o crescimento seria impossibilitado pela acção deletéria do arsénio não metabolizado.

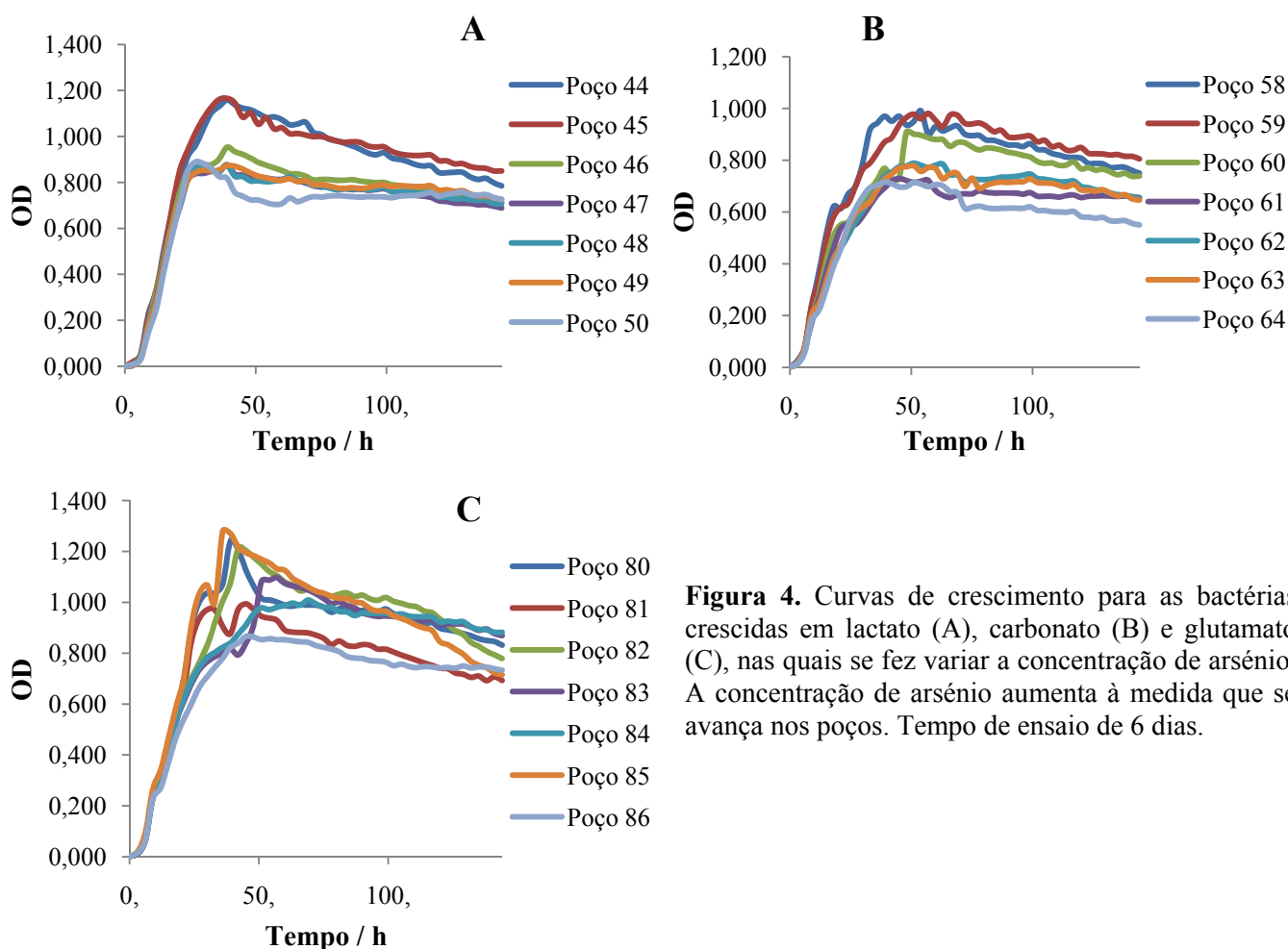
#### 4.3 Crescimento bacterianos influenciados pela variação de extracto de levedura e de arsénio, mas não pela variação de nitrato

Os ensaios de *Bioscreen* trouxeram informações intrigantes para o âmbito do projecto. Foi testada a influência relativa dos meios mínimos e completos no crescimento celular, variando-se a concentração de extracto de levedura contrariamente à de molibdénio. Os resultados apontam para uma dependência não esperada do crescimento no extracto de levedura, indiciando a presença de um factor molecular fundamental para o prosperar das bactérias estudadas.



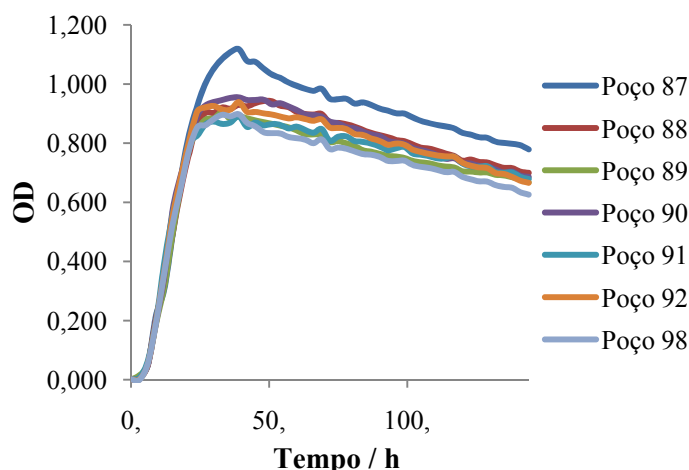
**Figura 3.** Curvas de crescimento para as bactérias crescidas em lactato (A), carbonato (B) e glutamato (C), nas quais se fez variar a concentração de extracto de levedura contrariamente à concentração de molibdénio. A concentração de extracto de levedura diminui com o avanço dos poços ao mesmo tempo que diminui a de molibdénio. No poço intermédio, a concentração de cada um é intermédia relativamente aos extremos. Tempo de ensaio de 9 dias.

A presença de arsénio foi também testada da mesma forma para as três fontes de carbono. Neste caso os resultados mostraram o que se esperava, com o aumento da concentração de arsénio o crescimento é diminuído. Curiosamente, utilizando a concentração de arsénio mais alta (semelhante à reportada por alguns autores como sendo o valor apropriado para ensaios de teste ao arsenito oxidase), o crescimento não foi anulado.



**Figura 4.** Curvas de crescimento para as bactérias crescidas em lactato (A), carbonato (B) e glutamato (C), nas quais se fez variar a concentração de arsénio. A concentração de arsénio aumenta à medida que se avança nos poços. Tempo de ensaio de 6 dias.

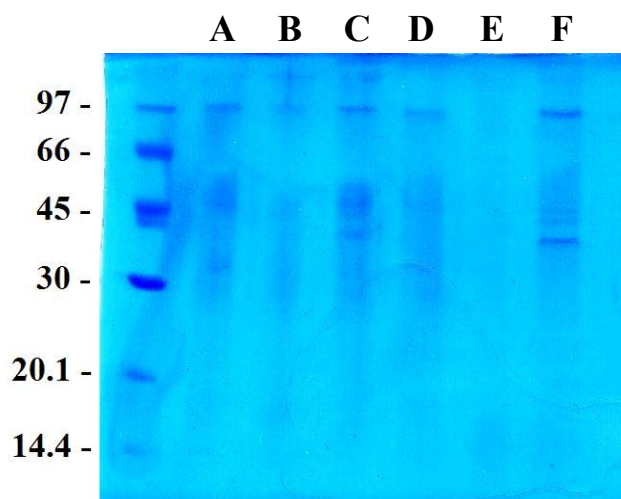
O último ensaio prendeu-se com a aplicação de uma variação de nitrato, que desde o início do nosso trabalho se equacionou como um possível substituto para o oxigénio, justificando os ensaios anaeróbicos prévios. A influência do nitrato foi apenas testada para as bactérias crescidas em lactato, uma vez que ensaios prévios descartaram a hipótese de influência nas outras fontes de carbono (ensaio realizado no primeiro *Bioscreen*, resultados não expostos).



**Figura 5.** Curvas de crescimento para as bactérias crescidas em lactato nas quais se fez variar a concentração de nitrato. A concentração de nitrato aumenta à medida que se avança nos poços. Tempo de ensaio de 6 dias.

#### 4.4 Necessários mais ensaios de proteómica para esclarecer questões bioquímicas

As bactérias crescidas em nefalómetro com arsénio e extracto de levedura foram recolhidas para os ensaios proteicos numa fases de pico do seu crescimento seguido pela OD do meio líquido (OD média de recolha na ordem dos 1.438). Após o tratamento descrito, as amostras foram corridas em gel de electroforese SDS-PAGE, com o electroforama resultante apresentado na Figura 6.



**Figura 6.** SDS-PAGE resultante da electroforese realizada para as bactérias crescidas na presença (D, E, F) e ausência (A, B, C) de arsénio, em nefalómetro. A e D – lactato; B e E – carbonato; C e F – Glutamato. Volume aplicado por poço de 10  $\mu$ L. Marcadores de massa molecular apresentados no lado esquerdo da figura (unidades KDa).

Os resultados para esta electroforese são altamente inconclusivos, uma vez que a resolução foi muito baixa, mesmo tendo-se tentado optimizar este parâmetro por sonificação das amostras antes da aplicação, diminuição da diferença de potencial aplicada e aumento da espessura do gel.

O que se concluiu ser o principal responsável pelos maus resultados foi o facto de após rebentamento das células, não se ter centrifugado para separação da fracção solúvel dos restos de membrana e de células não rebentadas.

Do gel que se obtém, aponta-se para alguma semelhança entre as culturas com e sem arsénio para a mesma fonte de carbono. À luz do sucedido não se podem retirar conclusões acertadas sobre as variações que o arsénio poderá imprimir na síntese proteica, nomeadamente, na expressão de arsenito oxidase.

No futuro deverão ser tratadas as amostras para estudo da fracção solúvel, bem como aplicar a mesma metodologia às bactérias crescidas em meios mínimos com arsénio (meios de molibdénio). O objectivo será sempre a comparação de proteomas das bactérias sem arsénio com proteomas das mesmas bactérias cultivadas com arsénio (por proteoma considere-se uma electroforese de elevada resolução e área de separação, realizada em duas dimensões, caracterizando com algum detalhe as proteínas separadas).

## 5. Conclusões

Apesar de não ter sido possível evidenciar com os resultados obtidos a existência de uma via alternativa que aproveitaria o arsénio como fonte alternativa para uma via energética secundária, comprovou-se que a fauna microbiana do Banco D. João de Castro suporta extensivamente condições extremas. Como elemento tóxico a exposição prolongada ao arsénio é concomitante com uma morte acelerada da maior parte dos organismos vivos. As bactérias dos sedimentos tratados neste projecto foram capazes de sobreviver e crescer em meios com uma concentração considerável de arsénio.

O molibdénio que se tomou como elemento fundamental para o enzima descrito, não foi directamente comprovado como sendo activo na destoxificação do arsénio mas os meios mínimos deste metal resultaram em crescimentos sólidos, prontos para análise futura (meios mínimos em nefalómetro que deverão ser analisados ao nível bioquímico).

Um trabalho que inicialmente aparentava ser compatível com um ano de desenvolvimento, provou ser demasiado complexo e relevante, sendo necessária a atenção sobre a questão que pelos dados recolhidos parece ter as potencialidade de se

propagar em estudos mais profundos de genómica, determinando-se linhagens celulares das bactérias cultivadas, proteómica, identificando a expressão de enzimas ligados ao metabolismo interno do arsénio.

Relativamente aos objectivos do trabalho, toda a parte pretendida relativamente ao estudo microbiológico foi atingido ficando em falta a compreensão bioquímica do problema, complementada com alguma análise espectrofotométrica. As principais razões para este facto terão sido por um lado o tempo de crescimento bacteriano alargado que, conjugado com a quantidade de ensaios necessários, consumiu muito do tempo e por outro lado a própria dificuldade de conjugação das aulas com o projecto desenvolvido unicamente por mim e pelo meu tutor.

As necessidades orçamentais foram compreendidas dentro do que era esperado quando o projecto foi submetido à fundação, sendo a maioria dos custos de material e equipamento cobertos pelo ICAT, local onde a maior parte do projecto foi desenvolvido.

Está-se neste momento a desenvolver o procedimento para melhoramento dos resultados da proteómica, nomeadamente no que toca ao tratamento das células crescidas em meios mínimos, que serão corridas em géis de duas dimensões. Se for caso de sucesso, estes resultados serão apresentados na sessão de apresentação sob a forma de **poster**.

## 6. Bibliografia

### Imagens

[1] [http://www.horta.uac.pt/projectos/Saber/200308/Bolhash\\_s65\\_25.jpg](http://www.horta.uac.pt/projectos/Saber/200308/Bolhash_s65_25.jpg)

### Referências bibliográficas

- (1) Anderson, G.L.; Williams, J.; Hille, R. (1992) The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem.* 267(33): 23674-23682
- (2) Chen, S.; Shao Z. (2009) Isolation and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in communities enriched from deep-sea sediments of the Southwest Indian Ocean Ridge. *Extremophiles.* 13(1): 39-48

- (3) Santini, J.M.; vanden Hoven, R.N. (2004) Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J Bacteriol.* **186**(6): 1614-1619
- (4) Santini, J.M.; Sly, L.I.; Schnagl, R.D.; Macy, J.M. (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol.* **66**(1): 92-97
- (5) Lebrun, E.; Brugna, M.; Baymann, F.; Muller, D.; Lièvremon, D.; Lett, M.C.; Nitschke, W. (2002) Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol Biol Evol.* **20**(5): 686-693
- (6) Muller, D.; Médigue, C.; Koechler, S.; Barbe, V.; Barakat, M.; Talla, E.; Bonnefoy, V.; Krin, E.; Arsène-Ploetze, F.; Carapito, C.; Chandler, M.; Cournoyer, B.; Cruveiller, S.; Dossat, C.; Duval, S.; Heymann, M.; Leize, E.; Lieutaud, A.; Lièvremon, D.; Makita, Y.; Mangelot, S.; Nitschke, W.; Ortet, P.; Perdrial, N.; Schoepp, B.; Siguier, P.; Simeonova, D.D.; Rouy, Z.; Segurens, B.; Turlin, E.; Vallenet, D.; Van Dorsselaer, A.; Weiss, S.; Weissenbach, J.; Lett, M.C.; Danchin, A.; Bertin, P.N. (2007) A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet.* **3**(4): e53
- (7) Prasad, K.S.; Subramanian, V.; Paul, J. (2009) Purification and characterization of arsenite oxidase from *Arthrobacter* sp. *Biomaterials.* **22**(5): 711-721
- (8) Inskeep, W.P.; Macur, R.E.; Hamamura, N.; Warelow, T.P.; Ward, S.A.; Santini, J.M. (2007) Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ Microbiol.* **9**(4): 934-943
- (9) Enemark, J.H.; Astashkin, A.V.; Raitsimring, A.M. (2006) Investigation of the coordination structures of the molybdenum(v) sites of sulfite oxidizing enzymes by pulsed EPR spectroscopy. *Dalton Trans.* (29): 3501-14
- (10) Chakravarty, R.; Banerjee, P.C. (2008) Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals. *Extremophiles.* **12**(2): 279-284
- (11) Hoke, K.R.; Cobb, N.; Armstrong, F.A.; Hille, R. (2004) Electrochemical studies of arsenite oxidase: an unusual example of a highly cooperative two-electron molybdenum center. *Biochemistry.* **43**(6): 1667-1674